



(19) Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) EP 0 723 017 A2

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
24.07.1996 Patentblatt 1996/30

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/54, C12N 9/10,  
C12Q 1/48, A01N 3/00,  
C12N 1/21, C12N 5/10

(21) Anmeldenummer: 96100458.7

(22) Anmelddatum: 13.01.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 23.01.1995 DE 19501906

(71) Anmelder: BASF AKTIENGESELLSCHAFT  
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:  
• Schmidt, Ralf-Michael, Dr.  
D-67434 Neustadt (DE)  
• Stitt, Marc, Prof. Dr.  
D-69221 Dossenheim (DE)  
• Sonnewald, Uwe, Dr.  
D-06467 Hoym (DE)

(54) Transketolase

(57) Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend  
eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von  
mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 dar-  
stellt, sowie für dieses Protein kodierende Nukleinsäu-  
ren und seine Verwendung.

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine mit Transketolase Aktivität, ihre Verwendung in Testsystemen, sowie Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren.

5 Pflanzen sind in der Lage, unter Verwendung von Lichtenergie aus atmosphärischem Kohlendioxid organische Verbindungen unter Sauerstoffbildung aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet.

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Photosyntheseprodukte das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen.

10 Da Pflanzen auf eine funktionierende Photosynthese angewiesen sind und vergleichbare Reaktionen in tierischen Organismen nicht vorkommen, bietet sich der Photosyntheseapparat als ideales Ziel für den Einsatz von Herbiziden an.

Die komplexen Reaktionen, die zur Kohlendioxiddfixierung führen unterteilt man in Licht- und Dunkelreaktion. Die Lichtreaktion dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP und von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. In der Dunkelreaktion (reduktiver Pentosephosphatzzyklus oder Calvin Zyklus) werden diese Verbindungen zur Synthese organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt.

15 Einige der bekannten Herbizide (z.B. Dichlorphenylmethylharnstoff oder Paraquat) wirken durch eine Inhibierung der Lichtreaktion. Die Dunkelreaktion wird als Angriffspunkt für Herbizide nicht genutzt.

Die Enzymreaktionen des reduktiven Pentosephosphatzzyklus werden in drei Abschnitte unterteilt:

a) Carboxylierung

20 b) Reduktion

c) Regenerierung.

Bei der Carboxylierung reagiert Kohlendioxid mit dem Akzeptormolekül Ribulose-Bisphosphat (RuBP), wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat

25 (3-PGA) gebildet werden. Anschließend wird 3-PGA nach Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. In der Regenerationsphase wird das Akzeptormolekül RuBP aus dem entstandenen GAP resynthetisiert. Von sechs gebildeten Molekülen GAP kann ein Molekül für andere Stoffwechselwege eingesetzt werden.

30 Eine Vielzahl der am reduktiven Pentosephosphatzzyklus beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für Herbizide dar. Eine besondere Stellung nimmt allerdings die plastidäre Transketolase ein. Wie die Transaldolase katalysiert die Transketolase (E.C. 2.2.1.1.) zwei Reaktionen:

(1)



35

(2)



40 Die an den Reaktionen beteiligten Substrate und Produkte stellen Verknüpfungspunkte des reduktiven Pentosephosphatzzykluses mit anderen Stoffwechselwegen dar. Exportierte Triosephosphate dienen im Zytosoma als Substrate für Glykolyse und Gluconeogenese. Fructose-6-Phosphat wird als Vorläufermolekül zur Herstellung von Stärke in den Plastiden genutzt. Erythrose-4-Phosphat ist ein Mittler zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Verknüpft mit Phosphoenolpyruvat mündet Erythrose-4-Phosphat in den Shikimat-Weg, der zur Synthese aromatischer Aminosäuren und phenolischer Substanzen führt.

45 Ribose-5-Phosphat wird in unterschiedlichen Stoffwechselwegen als Substrat verwendet.

In pflanzlichen Geweben wurden zwei Transketolase-Isoformen beschrieben, die sich in ihrer subzellulären Kompartimentierung unterscheiden (Murphy and Walker, 1982, *Planta* 155, 316-320).

50 Die plastidäre Transketolase ist in grünen Geweben für mehr als 75% der Gesamtaktivität verantwortlich. Das aktive Enzym liegt als Homotetramer (Holoenzym) mit einer relativen Molekularmasse von 150 kDa vor. Als Cofaktoren benötigt die Transketolase Vitamin B1 (Thiaminpyrophosphat) und Magnesium. In Abwesenheit von Thiaminpyrophosphat oder in Anwesenheit von Mercaptoethanol zerfällt das Tetramer in zwei Dimere (Apoenzyme) mit einer relativen Molekularmasse von je 74 kDa. Holo- und Apoenzym sind katalytisch aktiv, wobei das Holoenzym eine wesentlich höhere Aktivität als das Apoenzym aufweist.

55 Gene, die für Transketolase kodieren, wurden bisher aus *Saccharomyces cerevisiae* (Flechter et al., *Biochemistry* 31, 1892-1896, 1993; Sundström et al., *J. Biol. Chem.* 268, 24346-24352, 1993; Schaff-Gerstenschläger et al., *Eur. J. Biochem.* 217, 487-492, 1993), aus *Hansenula polymorpha* (Janowicz et al., *Nucl. Acids Res.* 13, 3043-3062, 1985), menschlichen Erythrozyten (Abedinia et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 1159-1166, 1992; McCool et al., *J. Biol. Chem.* 268, 1397-1404, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 266, 20447-20452, 1992)

und *Escherichia coli* (Sprenger, Biochem. Biophys. Acta 1216, 307-310, 1992; Tida et al., J. Bacteriol. 175, 5375-5383, 1993) isoliert und beschrieben. Gene pflanzlicher Transketolasen sind bisher nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine pflanzliche Transketolase in reiner Form durch Klonierung des entsprechenden Gens zur Verfügung zu stellen.

5 Demgemäß wurde ein Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz, gefunden.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Das in SEQ ID NO 2 dargestellte Protein ist ein sogenanntes Vorläuferprotein bestehend aus 743 Aminosäuren.

10 Das reife Protein ist aus der Vorläuferform durch Abspalten des chloroplastidären Transitpeptides, das gemäß einer Computeranalyse aus den N-terminalen 77 Aminosäuren besteht, erhältlich.

Sowohl das Vorläuferprotein, als auch durch Substitution, Deletion oder Insertion von Aminosäuren davon abgeleitete Proteine, die noch über eine Transketolase-Aktivität verfügen, gehören zu den erfindungsgemäßen Proteinen.

15 Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Val durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung; bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch eine oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Besonders bevorzugt sind Proteine, die durch N-terminale Verkürzungen um 20 bis 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 entstehen.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

30 Soll die pflanzliche Transketolase beispielsweise in einem Bakterium exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage des Bakteriums bei der Rückübersetzung zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die die für die erfindungsgemäße Transketolase kodierenden Nukleinsäuren zusammen mit funktionellen Regulationssignalen enthalten.

Darunter sind beispielsweise Signale für Transkription und Translation wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen oder für Replikation oder Integration notwendige Sequenzen zu verstehen.

35 Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich besonders zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen, insbesondere zur Auffindung von Transketolase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu können die Proteine beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Transketolase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen lässt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

40 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbicide, die mit einem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

45 Die Erfindung besteht außerdem in einem Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem oben beschriebenen Testverfahren überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

50 Daß die Transketolase inhibierende Eigenschaft einer Substanz allein nicht ausreicht für die Eignung als Herbizid, sondern noch weitere Prüfungen durchzuführen sind, ist jedem Fachmann geläufig.

Das Verfahren gestattet es jedoch reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

**Beispiele****A. Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen B zugrundeliegen:****5 1. Allgemeine Klonierungsverfahren**

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Transformation und Anzucht von *Pichia pastoris* wurde entsprechend den Angaben der Vertreiberfirma (Invitrogen Corporation) durchgeführt. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Vervliet et al. J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).

**15 2. Erzeugung von cDNA-Bibliotheken**

Zur Herstellung von Blatt-spezifischen cDNA Bibliotheken wurde Gesamt-RNA aus Tabakblättern nach einer von Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163, 21) beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurde die poly(A)-RNA über Oligo(dT)-Cellulose Type 7 (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 5 µg der so erhaltenen RNA für die cDNA Synthese eingesetzt. Alle für die Herstellung der cDNA notwendigen Chemikalien und Enzyme wurden durch die Firma Stratagene (La Jolla CA 92037, USA) bezogen. Die angewandten Methoden wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese des ersten und zweiten Stranges der cDNA wurde mit dem ZAP-cDNA Synthese Kit durchgeführt. Die erhaltenen doppelsträngigen cDNAs wurden anschließend mit EcoRI-NotI Adaptoren versehen und in einen EcoRI gespaltenen Lambda ZAPII Vektor kloniert. Nach in vitro Verpackung (Gigapack II Verpackungsextrakt) der rekombinanten Lambda DNA wurden XL-1 *E. coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Durch Auszählen der gebildeten Plaques wurde der Titer der cDNA-Bibliotheken bestimmt.

**3. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mittels heterologer DNA-Sonden**

$2 \times 10^5$  rekombinante Lambda Phagen (Lambda ZapII) einer blattspezifische cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurden auf Agarplatten ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham Buchler) transferiert und durch Inkubation für 2 Stunden bei 80°C auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonden dienten DNA-Fragmente, die mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Hybridisierung der Membran erfolgte nach Prähybridisierung bei 42°C in PEG-Puffer (Amasino (1986) Anal. Biochem. 152, 304-307) für 12-16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt.

**40 4. Sequenzanalyse rekombinanter DNA**

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem automatischen Laserfluoreszenz-DNA-Sequenziert (A.L.F.) der Firma Pharmacia unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467).

**45 5. Bakterienstämme und Hefestämme**

*E. coli* (XL-1 Blue) Bakterien wurden von der Firma Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation eingesetzte *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (C58CI mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Debleare et al. (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben. *Pichia pastoris* Stamm GS115 wurde von der Firma Invitrogen Corporation (San Diego, CA 92121, USA) bezogen.

**50 6. Tabaktransformation**

Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. (1962) 15,473) mit 2 % Saccharose und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/ml Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 1,6 % Glukose und 0,8 % Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht/8 Stunden

Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Clorotan und 0,8 % Bacto-Agar überführt.

7. Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

Gesamt RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20-40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA Moleküle wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylon Membran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

8. PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

Die PCR-Amplifikation der Transketolase zur Expression des Enzyms in *E. coli* und *Pichia* wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Reaktionsgemische enthielten 1 ng Template, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 0,25 mM Nukleotide (Pharmacia), Amplifikationspuffer (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 0,01 % Tween 20, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 2,5 Einheiten der Tth DNA Polymerase (Biomaster, Crottendorfer Str. 25, 51109 Köln). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur: 60°C  
 Denaturierungstemperatur: 94°C  
 Elongationstemperatur: 72°C  
 Anzahl der Zyklen: 30

9. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Zur Überexpression der Transketolase in *E. coli* wurden 2 ml einer bei 28°C angezogenen Übernachtkultur in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1 mM MgSO<sub>4</sub>) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auf trennung der Proteine in einem SDS-PAGE (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt.

B. Ausführungsbeispiele

1. Klonierung der plastidären Transketolase

Aus einer blattspezifischen cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurde ein Klon, der für Transketolase kodiert, ausgewählt. Die DNA Sequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt.  
 Der 2629 Basenpaar lange cDNA-Klon 21 enthält einen offenen Leseraster von 2229 Basen und kodiert für ein Protein mit 743 Aminosäuren. Analyse des Polypeptides unter Verwendung des Sequenzprogramms PC/Gene (Untermenü TRANSPEP) ergab, daß am N-Terminus des Proteins ein chloroplastidäres Transitpeptid von vermutlich 77 Aminosäuren vorhanden ist.

2. Vergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit bekannten Transketolase Proteinsequenzen

Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons TK-23 (MacMolly Sequenzanalyse Programm von Macintosh) mit publizierten Transketolase-Sequenzen ergaben, daß im Bereich des vermutlich reifen Polypeptides (Aminosäure 78 bis 743) die höchsten Homologien zu Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehen (Abbildung 4). Die Sequenz des reifen Proteins (bestimmt durch Computervorhersage) ist zu 47,7 % bzw. 44,1 % identisch mit der Transketolase 1 bzw. 2 Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Geringere Sequenzhomologien wurden zu den übrigen Transketolasen gefunden. Keine Sequenzhomologie wurde für den Bereich des Transitpeptides ermittelt.

3. Expressionsanalyse der plastidären Transketolase

Expressionsanalysen einiger am Calvin Cyclus beteiligter Enzyme (RUBISCO, FBPase) haben ergeben, daß die Akkumulation der entsprechenden Transkripte an grünes Gewebe und Licht gebunden ist. Zur Überprüfung der gewebspezifischen Expression der Transketolase in Tabakpflanzen wurde Gesamt-RNA aus Sinkblättern, Sourceblättern, Blütenknospen, Stengeln (Internodien, Nodien und Mark), Wurzeln und geöffneten Blüten wachsender Tabakpflanzen isoliert. Nach Auf trennung in Agarosegelen und Bindung der RNA auf Nylonmembranen wurde die Anwesenheit Transketolase spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit der radioaktiven TK-23 cDNA nachgewiesen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind Transketolase-spezifische Transkripte in allen getesteten

Organen nachweisbar. Dieser Befund verdeutlicht, daß im Gegensatz zu anderen Enzymen des Calvin Cyclus, die Transketolase neben ihrer Funktion im Calvin Cyclus weitere Aufgaben im pflanzlichen Stoffwechsel erfüllt.

4. Antisenseinhibition der Transketolase in transgenen Tabakpflanzen

Um transgene Tabakpflanzen mit verminderter Transketolaseaktivität zu erzeugen, wurden die cDNA Klonen TK-26 und TK-28 in Gegenrichtung mit einem konstitutiven Expression bewirkenden Promotor sowie einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Die Plasmide BinAR-anti-TK-26 und BinAR-anti-TK-28 bestehend aus den drei Fragmenten A, der jeweiligen cDNA (s. Abb. 6, TK-26 und TK-28) und C wurden durch Insertion der entsprechenden cDNA Sequenzen in den Expressionsvektor pBinAR (Abb. 7A) erzeugt.

Das Fragment A beinhaltet den 35S CaMV Promoter. Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik Virus (CaMV) umfaßt (Franck et al. (1980) Cell 21, 285). Es wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. (1986) Nucleic Acid Res. 14, 5857) isoliert. Die TK-26 cDNA wurde aus dem pBluescript SK- (Abb. 6) als Xba-SalI Fragment und die TK-28 cDNA als BamHI Fragment in Gegenrichtung in den pBinAR Vektor kloniert (Abb. 7B und C). Das Fragment C enthält das Polyadenylierungs-signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984); EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, welches als PvuII-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al. (1983); Nature 303,209) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-Hin-dIII Schnittstelle des Vektors kloniert worden war.

Die erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe des Agrobacteriumsystems in Tabak transformiert. Transformierte Tabak-pflanzen wurden auf Antibiotika haltigem Medium angezogen und die erfolgreiche Inhibition der Transketolase wurde durch Bestimmung der Transkriptmenge mittels Northern Experimenten ermittelt. Für jede Transformation (TK-26 und TK-28) wurden 100 unabhängige Transformanden untersucht. In Abbildung 8 ist das Ergebnis eines Northern-Experimentes dargestellt. In den meisten regenerierten Pflanzen konnte keine Reduktion der Transketolase mRNA nachgewiesen werden. Einige der Pflanzen zeigten allerdings eine starke Verminderung der Transketolase-spezifischen Transkripte (z.B. anti-TK-26 No. 26; Abb. 8). Die Reduktion der Transkriptmenge führte zu einer Unterdrückung des Pflanzenwachstums. Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus führte zu einem Absterben der inhibierten Pflanzen.

5. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9

Zur Etablierung eines molekularen Testsystems wurde die pflanzliche Transketolase in mikrobiellen Systemen überexprimiert.

Zur Expression der Transketolase in *E. coli* wurde die TK-23 Sequenz, die für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als SalI Fragment in die SalI-Schnittstelle des Vektors PQE-9 (DIAGEN GmbH, QLAGEN Inc.) kloniert (Abb. 10).

6. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9 und TK23-BC-pHIL-D2

Da eukaryotische Enzyme häufig nur unzureichend in bakteriellen Systemen exprimiert werden können, wurden zwei weitere Plasmidkonstruktionen durchgeführt, die eine Expression in *Pichia pastoris* (Stamm GS115; Firma Invitrogen Corporation San Diego, CA 92121, USA) ermöglichen.

Zur Sekretion des Transketolase Proteins wurde das Plasmid TK23-AC-pPIC-9 konstruiert. Zur Fusion des Transketolase Proteins mit einem Hefe Signalpeptid wurde ein Teil der TK-23 Sequenz, der für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pPIC-9 des *Pichia* Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 11). Um eine intrazelluläre Akkumulation des Transketolase Enzyms zu gewährleisten wurde das Plasmid TK23-BC-pHIL-D2 hergestellt. Zur besseren Aufréinigung des Enzyms wurde ein 5'-PCR Primer (s. Abb. 9) zur Amplifikation der Transketolase verwendet, der ein Startkodon für die Translation enthält und für sechs Histidinreste kodiert. Nach PCR-Amplifikation der in Abbildung 9 angegebenen TK-23 Sequenz wurde das TK-23-BC-Produkt in den Vektor pGEM-T kloniert. Das TK23-BC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pHIL-D2 des *Pichia* Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 12).

7. Expression der pflanzlichen Transketolase in *E. coli*

Zur Überexpression der Transketolase in *E. coli* wurden 2 ml LB-Medium mit XL-1 *E.coli* Zellen beimpft, die das Plasmid TK23-AC-pQU-9 enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28°C in Anwesenheit von Antibiotika und unter Schütteln angezogenen. Anschließend wurden die Übernachtkulturen in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit: 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1mM MgSO<sub>4</sub>) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auftrennung der Proteine

in einem SDS-PAGE (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die entweder nicht mit IPTG induziert wurden, oder Kulturen, die die Transketolase in Gegensinnorientierung enthielten. Das Ergebnis eines Induktions-Experiments ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein Protein der entsprechenden Größe akkumulierte in Bakterienkulturen, die mit IPTG induziert wurden und das Plasmid TK23-AC-pQE-9 enthielten. Die Akkumulation beginnt eine Stunde nach Induktion. In den Kontrollen (ohne IPTG bzw. Transketolase in Gegensinnorientierung) ist kein vergleichbares Protein identifizierbar.

5  
Abbildungen

- 10 1. Reduktiver Pentosephosphatzzyklus  
2. Verknüpfung des Pentosephosphatzzyklus mit anderen Stoffwechselwegen  
3. Nukleotidsequenz der plastidären Transketolase aus Tabak  
4. Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase mit Transketolase 1 und 2 aus Hefe  
5. Nachweis der Transketolase mRNA in unterschiedlichen Tabakgeweben  
15 6. Schematische Darstellung der Transketolase cDNA-Klone  
7. Schematische Darstellung der Plasmide BinAR-TK-26-anti und BinAR-TK-28-anti  
8. Northernanalyse transgener Tabakpflanzen  
9. Strategie und Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase  
10. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9  
20 11. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9  
12. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-BC-pHIL-D2  
13. Überexpression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER:  
10 (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft  
(B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38  
15 (C) ORT: Ludwigshafen  
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
20 (F) POSTLEITZAHL: D-67056  
(G) TELEPHON: 0621/6048526  
25 (H) TELEFAX: 0621/6043123  
(I) TELEX: 1762175170  
30 (ii) ANMELDETITEL: Transketolase aus Pflanzen  
(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2  
(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:  
35 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
40 (A) LÄNGE: 2629 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear  
45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Nicotiana  
(ix) MERKMALE:  
50 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 60..2289  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

	CTCCTCTTCA CTCTCTTTTC TCTTGAGAC AAAACATCAA ACACCTTAAC GGTAAAGCC	59
5	ATG GCG TCT TCT CTC ACT CTC TCT CAA GCT ATC CTC TCT CGT Met Ala Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg 1 5 10 15	107
	TCT GTC CCT CGC CAT GGC TCT GCC TCT TCT CAA CTT TCC CCT TCT Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser 20 25 30	155
10	TCT CTC ACT TTT TCC GGC CTT AAA TCC AAT CCC AAT ATC ACC ACC TCC Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser 35 40 45	203
	CGC CGC CGT ACT CCT TCC GCC GCC GCC GCC GTC GTA AGG TCA	251
15	Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser 50 55 60	
	CCG GCG ATT CGT GCC TCA GCT GCA ACC GAA ACC ATA GAG AAA ACT GAG Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu 65 70 75 80	299
20	ACT GCG CTT GTT GAC AAA TCT GTA AAC ACG ATT CGA TTT TTG GCT ATT Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile 85 90 95	347
	GAT GCT GTT GAA AGG CAA ATT CGG GTC ACC CGG TTT GCC ATG GGT TGT Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys 100 105 110	395
25	GCT CCG ATG GGT CAT ATA TTG TAC GAT GAG GTT ATG AGG TAT AAC CCG Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro 115 120 125	443
30	AAA AAC CCG TAT TGG TTT AAT CGG GAT CGG TTT GTT CTA TCA GCT GGA Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly 130 135 140	491
	CAT GGT TGT ATG CTT CAG TAT GCT TTG CTT CAT CTA GCT GGC TAT GAT His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp 145 150 155 160	539
35	GCT GTC AGG GAA GAG GAC TTG AAG AGC TTC CGT CAG TGG GGA ACC AAA Ala Val Arg Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys 165 170 175	587
40	ACC CCT GGA CAC CCT GAA AAC TTT GAG ACA CCT GGT GTT GAA GTC ACC Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr 180 185 190	635
	ACC GGG CCT CTG GGA CAA GGT ATT GCC AAC GCC GTT GGC TTG GCT CTT Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu 195 200 205	683
45	G TG GAG AAA CAC TTG GCT GCT CGT TTC AAT AAG CCT GAC GCT GAG ATT Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile 210 215 220	731
50	GTA GAC CAC TAC ACA TAT GTT ATT CTC GGT GAT GGT TGC CAG ATG GAG Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu 225 230 235 240	779

	GGT ATT TCA CAA GAA GCT TGT TCC CTT GCT GGA CAC TGG GGA CTT GGA	827
	Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly	
5	245 250 255	
	AAG CTG ATT GCT TTC TAT GAT GAC AAC CAC ATC TCA ATT GAT GGT GAC	875
	Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp	
	260 265 270	
10	ACA GAA ATC GCT TTC ACT GAG GAT GTT GGT GCC CGT TTT GAG GCT CTT	923
	Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu	
	275 280 285	
	GGG TGG CAC GTA ATC TGG GTG AAG AAC GGT AAC ACT GGT TAT GAT GAG	971
	Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu	
15	290 295 300	
	ATT CGT GCT GCT ATT AAG GAA GCA AAA ACT GTC ACA GAC AAA CCC ACT	1019
	Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr	
	305 310 315 320	
20	ATG ATC AAG GTG ACT ACA ACC ATT GGT TTT GGC TCG CCC AAC AAG GCA	1067
	Met Ile Lys Val Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala	
	325 330 335	
	AAC AGT TAC AGT GTA CAT GGA AGT GCA CTT GGA GCT AAG GAA GTA GAG	1115
	Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu	
25	340 345 350	
	GCC ACC AGG AGT AAC TTG GGA TGG CCT TAT GAG CCT TTC CAT GTG CCT	1163
	Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro	
	355 360 365	
30	GAA GAT GTC AAG AGC CAT TGG AGT CGT CAT GTT CCC GAG GGT GCT GCT	1211
	Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala	
	370 375 380	
	CTT GAA GCT GGG TGG AAT ACC AAG TTT GCT GAA TAT GAG AAG AAG TAC	1259
	Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr	
35	385 390 395 400	
	CCA GAG GAA GCT GCA GAA CTC AAA TCC ATT ACT ACT GGT GAA CTA CCT	1307
	Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro	
	405 410 415	
40	GCT GGC TGG GAG AAA GCT CTT CCT ACC TAC ACA CCT GAA AGT CCA GCG	1355
	Ala Gly Trp Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala	
	420 425 430	
	GAT GCC ACC AGA AAC CTG TCC CAA CAA AAC CTG AAT GCT CTT GCC AAG	1403
	Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys	
45	435 440 445	
	GTT CTT CCT GGT TTC CTT GGT GGT AGT GCT GAT CTT GCC TCA TCA AAC	1451
	Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn	
	450 455 460	
50	ATG ACC CTC ATG AAA ATG TTT GGT GAC TTC CAA AAG AAC ACC CCA GAG	1499
	Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu	
	465 470 475 480	

	GAG CGT AAT CTA AGG TTT GGT GTT CGT GAA CAT GGT ATG GGA GCC ATA Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile 485 490 495	1547
5	TGT AAT GGT AAT GCT CTA CAC AGC CCT GGC TTG ATT CCC TAC TGT GCT Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala 500 505 510	1595
10	ACT TTC TTT GTG TTC ACC GAC TAC ATG AGA GGA GCT ATG AGA ATT TCA Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser 515 520 525	1643
15	GCC TTG TCT GAG GCT GGA GTT ATT TAT GTT ATG ACC CAC GAT TCA ATT Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile 530 535 540	1691
20	GGT CTA GGA GAA GAT GGG CCT ACC CAT CAA CCC ATT GAG CAC TTG CCA Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro 545 550 555 560	1739
25	AGT TTC CGT GCA ATG CCC AAC ATT CTG ATG TTC CGT CCA GCA GAT GGC Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly 565 570 575	1787
30	AAG GAG ACA GCG GGA GCT TAC AAG GTG GCT GTC CTC AAG AGG AAG ACA Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr 580 585 590	1835
35	CCA TCA ATC CTT GCC CTC TCT CGG CAA AAG TTG CCA CAA CTT GCT GGA Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly 595 600 605	1883
40	AGT TCT ATT GAA GGA GCA GCA AAG CGT GGC TAC ATT TTA TCA GAC AAT Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn 610 615 620	1931
45	TCT TCT GGC AAC AAA CCT GAT GTC ATT TTG ATT GGT ACT GGC TCA GAG Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu 625 630 635 640	1979
50	TTA GAA ATT GCT GTC AAG GCT GAT GAA CTC AGG AAA GAA GGA AAA Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys 645 650 655	2027
55	GCA GTG AGA GTT GTT TCC TTT GTT TGT TGG GAG CTT TTT GAA GAA CAA Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln 660 665 670	2075
60	TCA GCC GAC TAC AAG GAA AGT GTC CTT CCA TCA TCT GTT ACA GCT AGA Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg 675 680 685	2123
65	GTT AGC ATT GAG GCC GGA TCC ACA TTT GGG TGG GAG AAA TAT GTC GGA Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly 690 695 700	2171
70	TCA AAG GGG AAG GCC ATC GGA ATT GAC AGA TGG GGT GCC AGT GCC CCT Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro 705 710 715 720	2219

	GCT GGA AAA ATA TAC AAG GAG TAC GGA ATT ACA GCA GAG GCT GTT GTA	2267
	Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val	
5	725 730 735	
	GCT GCA GCT AAA CAA GTT TCT T AGGCTTTATT ACTTACCCCTT GGTTGCTGGT	2319
	Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser	
	740	
10	GTCTACCAAA TTGTTTCA TTGAAACT GAGGTTGGAG ATAACGGTGG AAACCAATAC	2379
	CAAACGGACT CGGCAGTTCA CTGTTGCCCTG GTATTTCAA TAAAAACTAT TTCTTCATCT	2439
	GTCCTTGTT TTCTTCAGTT TTAGTAGCGG AGCGGCCAAA ATGAATCCAA GATGAGGATA	2499
	GAAATAGGAT TATGGATGCT CCTGACCATG TACACTTAAA ACATATCTGT GAGTTTGTA	2559
	ATTTTATTTG GTCGAGTGAT ACCAAGATCT CATTTCAT TGAAAAAAA AAAAAAAA	2619
15	AAAAAAA	2629
	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:	
	(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:	
	(A) LÄNGE: 743 Aminosäuren	
20	(B) ART: Aminosäure	
	(D) TOPOLOGIE: linear	
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
25	Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg	
	1               5               10               15	
	Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser	
	20               25               30	
30	Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser	
	35               40               45	
	Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser	
	50               55               60	
	Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu	
35	65               70               75               80	
	Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile	
	85               90               95	
	Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys	
	100               105               110	
40	Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro	
	115               120               125	
	Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly	
	130               135               140	
45	His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp	
	145               150               155               160	
	Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys	
	165               170               175	
50	Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr	
	180               185               190	
	Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu	
	195               200               205	

	Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile			
	210	215	220	
5	Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu			
	225	230	235	240
	Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly			
	245	250	255	
10	Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp			
	260	265	270	
	Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu			
	275	280	285	
	Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu			
15	290	295	300	
	Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr			
	305	310	315	320
	Met Ile Lys Val Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala			
	325	330	335	
20	Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu			
	340	345	350	
	Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro			
	355	360	365	
25	Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala			
	370	375	380	
	Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr			
	385	390	395	400
	Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro			
30	405	410	415	
	Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala			
	420	425	430	
	Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys			
35	435	440	445	
	Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn			
	450	455	460	
	Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu			
	465	470	475	480
40	Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile			
	485	490	495	
	Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala			
	500	505	510	
45	Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser			
	515	520	525	
	Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile			
	530	535	540	
	Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro			
50	545	550	555	560
	Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly			
	565	570	575	

Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr  
                  580                 585                 590  
 5 Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly  
                  595                 600                 605  
 Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn  
                  610                 615                 620  
 10 Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu  
                  625                 630                 635                 640  
 Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys  
                  645                 650                 655  
 15 Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln  
                  660                 665                 670  
 Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg  
                  675                 680                 685  
 20 Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly  
                  690                 695                 700  
 Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro  
                  705                 710                 715                 720  
 25 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val  
                  725                 730                 735  
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser  
                  740

30

**Patentansprüche**

- 35 1. Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt.  
 2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 78-743 aus SEQ ID NO 2 enthält.  
 40 3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ ID NO 2 dargestellte Sequenz enthält.  
 45 4. Nukleinsäure, codierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1-3.  
 5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.  
 50 6. Vektoren, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 4 oder 5 zusammen mit funktionellen Regulationssignalen.  
 7. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1-3 zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen.  
 55 8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung mittels eines in vitro Testsystems erfolgt.  
 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Testsystem ein Enzymhemmtest eingesetzt wird.

**EP 0 723 017 A2**

**10.** Testsystem zur Identifizierung von Transketolase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die potentiellen Inhibitoren mit einem Protein gemäß Anspruch 1-3 inkubiert und anschließend die Transketolase Aktivität bestimmt.

**5 11.** Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 10.

**12.** Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem Testverfahren gemäß Anspruch 10 überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

**10**

**15**

**20**

**25**

**30**

**35**

**40**

**45**

**50**

**55**

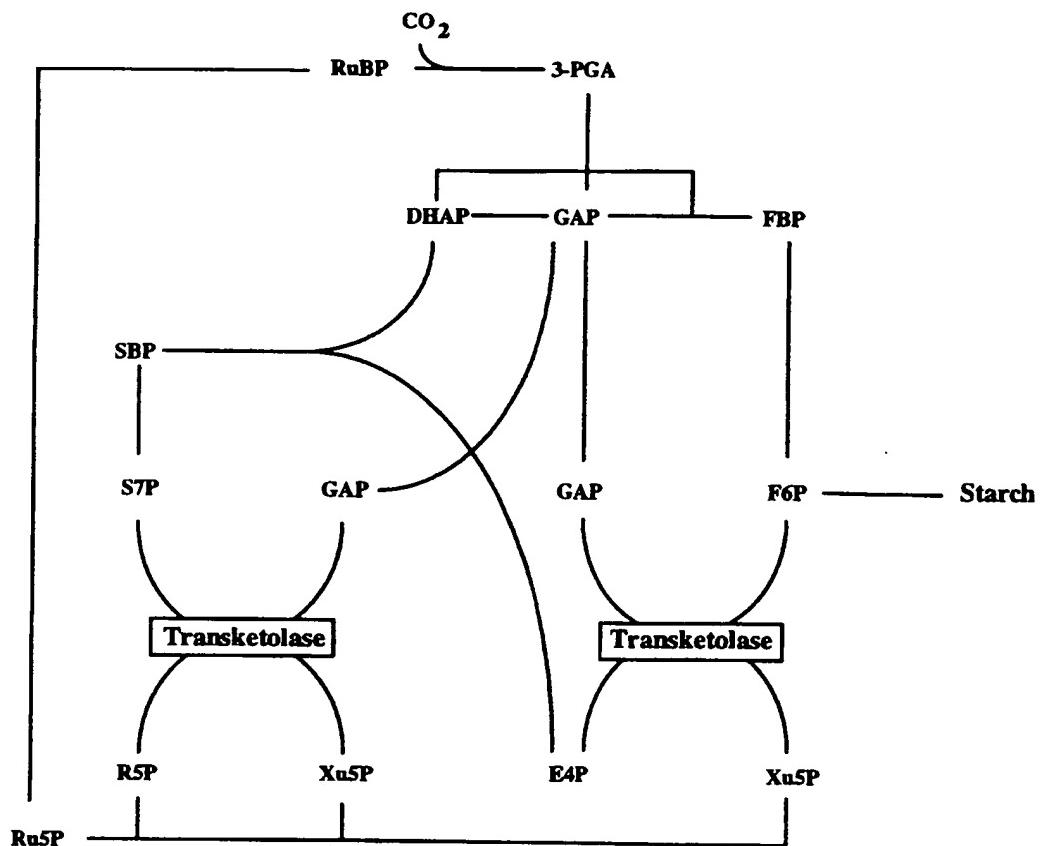


Abbildung 1

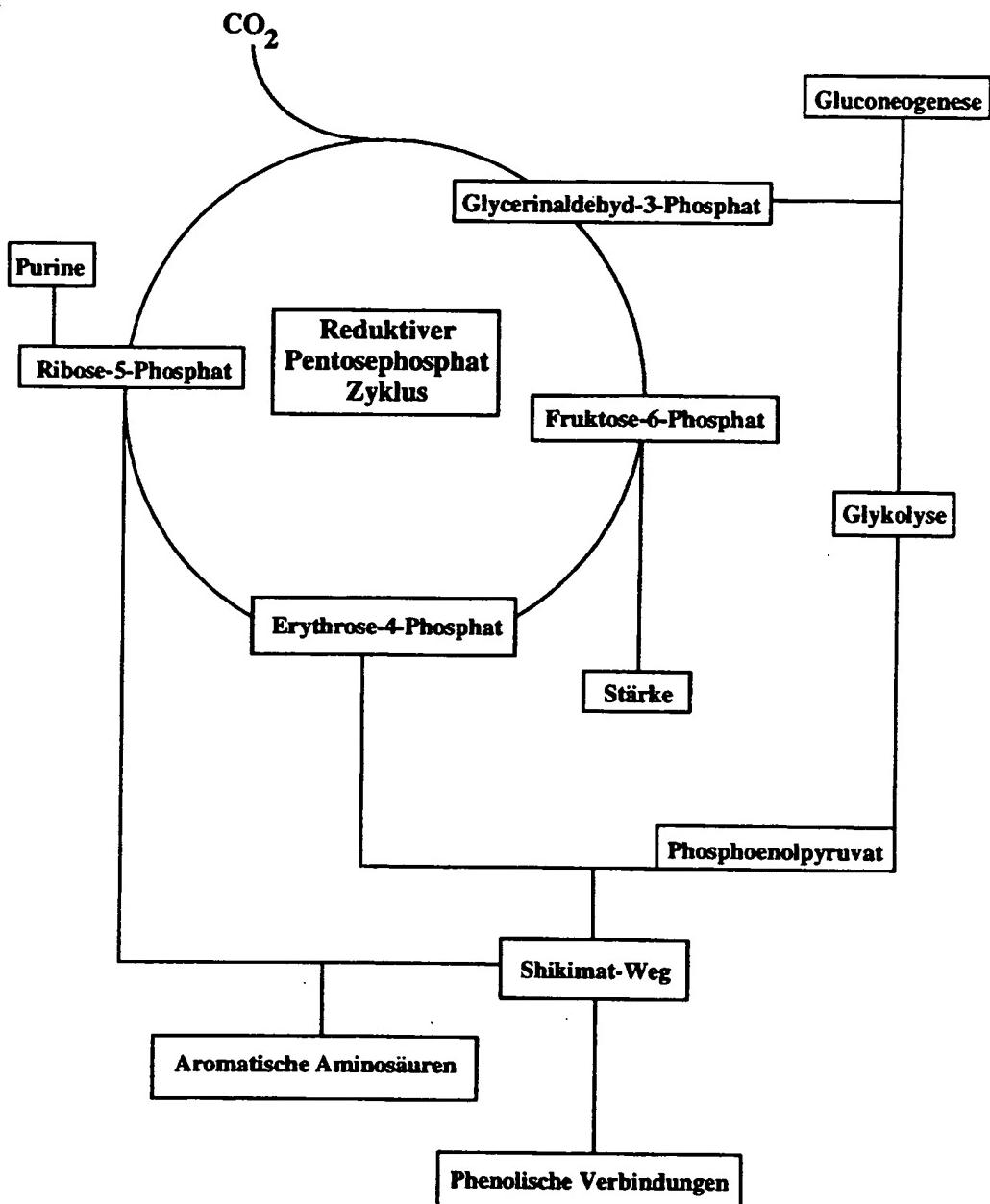


Abbildung 2

1	CTCCTCTTCA	CTCTCTTTTC	TCTTTGAGAC	AAAACATCAA	ACACCTTACT	50
51	GGTAAAGCCA	TGGCGTCTTC	TTCTTCTCTC	ACTCTCTCTC	AAGCTATCCT	100
101	CTCTCGTTCT	GTCCCTCGCC	ATGGCTCTGC	CTCTTCTCTC	CAACTTCCC	150
151	CTTCTCTCTC	CACTTTTTC	GGCCTTAAAT	CCAATCCCAA	TATCACCAACC	200
201	TCCCCGCCGC	GTACTCCTTC	CTCCGCCGCC	GCCGCCGCCG	TCGTAAGGTC	250
251	ACCGGGATT	CGTGCCCTAG	CTGCAACCGA	AACCATAGAG	AAAACTGAGA	300
301	CTGCGCTTGT	TGACAAATCT	GTAAACACGA	TTCGATTTT	GGCTATTGAT	350
351	GCTGTGAAA	GGCAAATTG	GGTCACCCGG	TTTGCATGG	GTTGTGCTCC	400
401	GATGGGTCA	ATATTGTACG	ATGAGGTTAT	GAGGTATAAC	CCGAAAAAAC	450
451	CGTATTGGTT	TAATCGGGAT	CGGTTGTTTC	TATCAGCTGG	ACATGGTTGT	500
501	ATGCTTCAGT	ATGCTTTGCT	TCATCTAGCT	GGCTATGATG	CTGTCAGGGA	550
551	AGAGGACTTG	AAGAGCTTCC	GTCAGTGGGG	AAGCAAAACC	CCTGGACACC	600
601	CTGAAAACCT	TGAGACACCT	GGTGTGAAAG	TCACCACCGG	GCCTCTGGGA	650
651	CAAGGTATTG	CCAACGCCGT	TGGCTTGGCT	CTTGTGGAGA	AACACTTGGC	700
701	TGCTCGTTTC	AATAAGCTG	ACGCTGAGAT	TGTAGACCAC	TACACATATG	750
751	TTATTCTCGG	TGATGGTTGC	CAGATGGAGG	GTATTTACA	AGAAGCTTGT	800
801	TCCCTTGCTG	GACACTGGGG	ACTTGAAAG	CTGATTGCTT	TCTATGATGA	850
851	CAACCACATC	TCAATTGATG	GTGACACAGA	AATCGTTTC	ACTGAGGATG	900
901	TTGGTGCCCG	TTTGAGGCT	CTTGGGTGGC	ACGTAATCTG	GGTGAAGAAC	950
951	GGTAACACTG	GTATGATGA	GATTGCGCT	GCTATTAAGG	AAGCAAAAC	1000
1001	TGTCACAGAC	AAACCCACTA	TGATCAAGGT	GACTACAACC	ATTGGTTTTG	1050
1051	GCTCGCCCAA	CAAGGCAAAC	AGTTACAGTG	TACATGGAAG	TGCACTTGGG	1100
1101	GCTAAGGAAG	TAGAGGCCAC	CAGGAGTAAC	TTGGGATGGC	CTTATGAGCC	1150
1151	TTTCCATGTG	CCTGAAGATG	TCAAGAGCCA	TTGGAGTCGT	CATGTTCCCG	1200
1201	AGGGTGTGTC	TCTTGAAGCT	GGGTGGAATA	CCAAGTTGTC	TGAATATGAG	1250
1251	AAGAAGTACC	CAGAGGAAGC	TGCAGAACTC	AAATCCATTA	CTACTGGTGA	1300
1301	ACTACCTGCT	GGCTGGGAGA	AAGCTCTTCC	TACCTACACA	CCTGAAAGTC	1350
1351	CAGCGGATGC	CACCAGAAC	CTGTCACCAAC	AAAACCTGAA	TGCTCTTGCC	1400
1401	AAGGTTCTTC	CTGGTTTCTC	TGGTGTAGT	GCTGATCTTG	CCTCATCAAA	1450
1451	CATGACCCCTC	ATGAAAATGT	TTGGTGACTT	CCAAAAGAAC	ACCCCAGAGG	1500
1501	AGCGTAATCT	AAGGTTGGT	GTCGTTGAAC	ATGGTATGGG	AGCCATATGT	1550
1551	AATGGTAATG	CTCTACACAG	CCCTGGCTTG	ATTCCCTACT	GTGCTACTTT	1600
1601	CTTGTGTTTC	ACCGACTACA	TGAGAGGAGC	TATGAGAATT	TCAGCCTTGT	1650
1651	CTGAGGCTGG	AGTTATTGAT	GTATGACCC	ACGATTCAAT	TGGCTTAGGA	1700
1701	GAAGATGGGC	CTACCCATCA	ACCCATTGAG	CACTTGGCAA	GTTTCCGTGC	1750
1751	AATGCCAAC	ATTCTGATGT	TCCGTCAGC	AGATGGCAAG	GAGACAGCGG	1800
1801	GAGCTTACAA	GGTGGCTGTC	CTCAAGAGGA	AGACACCATC	AATCTTGCC	1850
1851	CTCTCTCGGC	AAAAGTTGCC	ACAACCTGCT	GGAAGTTCTA	TTGAAGGAGC	1900
1901	AGCAAAGGGT	GGCTACATT	TATCAGACAA	TTCTTCTGGC	AAACAAACCTG	1950
1951	ATGTCATTTT	GATTGGTACT	GGCTCAGAGT	TAGAAATTG	TGTCAAGGCT	2000
2001	GCTGATGAAC	TCAGGAAAGA	AGGAAAAGCA	GTGAGAGTTG	TTTCCTTGT	2050
2051	TTGTTGGGAG	CTTTTGAAG	AACAATCAGC	CGACTACAAG	GAAAGTGTCC	2100
2101	TTCCATCATC	TGTTACAGCT	AGAGTTAGCA	TTGAGGCCGG	ATCCACATTT	2150
2151	GGGTGGGAGA	AATATGTCGG	ATCAAAGGGG	AAGGCCATCG	GAATTGACAG	2200
2201	ATGGGGTGCC	AGTGCCCTG	CTGGAAAAAT	ATACAAGGAG	TACGGAATT	2250
2251	CAGCAGAGGC	TGTTGTAGCT	GCAGCTAAC	AAGTTCTTA	GGCTTTATTA	2300
2301	CTTACCCCTG	GTGCTGGTG	TCTACCAAT	TTGTTTCTAT	TTTGAAACTG	2350
2351	AGGTTGGAGA	TAACGGTGA	AACCAATACC	AAACGGACTC	GGCAGTTCAC	2400
2401	TGTTGCTTGG	TATTTCAAT	AAAAACTATT	TCTTCATCTG	TCCTTTGTTT	2450
2451	TCTTCAGTTT	TAGTAGCGGA	GCGGCCAAAA	TGAATCCAAG	ATGAGGATAG	2500
2501	AAATAGGATT	ATGGATGCTC	CTGACCATGT	ACACTAAAAA	CATATCTGTG	2550
2551	AGTTTGTAA	TTTATTG	TCGAGTGATA	CCAAGATCTC	ATTTCAATT	2600
2601	GGAAAAAA	AAAAAA	AAAAAA			2629

Abbildung 3

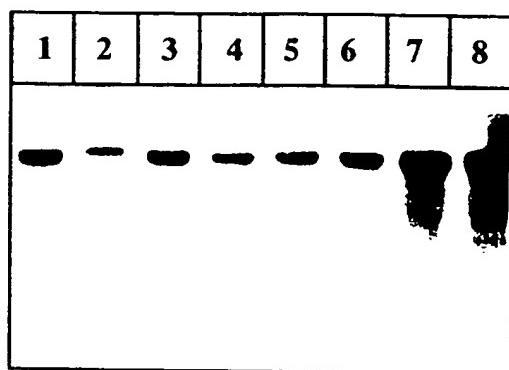
## Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit Transketolase

Isoenzyme aus *Saccharomyces cerevisiae*

TK-23	1	MASSSSL TLSQAILSRS	17
TK-23	18	VPRHGSASSS QLSPSSLTFS GLKSNPNIIT SRRRTPSSAA AAAVVRSPAI RASAATETIE	77
TK-23	78	KTTETALVDKS -VNTIRFLAI DAVERQIRVT RFAMCCAPMG HILYDEVMR Y NPKNPYWFNR	136
TKL1	1	M.QFTDI..L A.S...I..V .T.SKANSGH PG.PLGMAPA AHVLWSQ..M ..T..D.I..	60
TKL2	1	MAQFSDI..L A.S.L.L.SV .Q..SAQSGH PG.PLGLAPV AHVIFKQL.C ..N.EH.I..	60
TK-23	137	DRFVLSAGHG CMLQYALLHL AGYDAVREED LKSFRQWGSK TPGHPEMFET PGVEVITGPL	196
TKL1	61	.....N..A VA.L.SM... T...L-SI... .Q...L..R .....L .....	118
TKL2	61	.....N..S .A.L.SM... L...Y-SI... .RQ...VN.R .....HS A...I.S...	118
TK-23	197	GQGIANAVGL ALVEKHLLAR FNKPDAEIVD HYTYVILGDG CQMEGISQEA CSLAGHWCLG	256
TKL1	119	....S....M .MAQAN...T Y...GFTLS. N....F.... .LQ....S.. S....LK..	178
TKL2	119	....S....M .IAQANF..T Y.EDGFP.S. S..FA.V... .LQ..V.S.T S....LQ..	178
TK-23	257	KLIAFYDDNH ISIDGDTIEA FTEDVGARFE ALGWVVIWVK NGNTGYDEIR AAIKEAKTVT	316
TKL1	179	N...I....K .T...A.S.S .D...AK.Y. .Y..E.LY.E ...EDLAG.A K..AQ..LSK	238
TKL2	179	N..T..S.S ....K.SYS .D...LK.Y. .Y..E.ME.D K.DDDMES.S S.LEK..LSK	238
TK-23	317	DKPTMIKVTT TIGFGSPNKA NSYSVHGSAL GAKEVEATRS NLGW-PYEPP HVPEVKSHW	375
TKL1	239	....L..M. ....Y..LHAG -.H....AP. K.DD.KQLKS KP.FN.DKS. V..QE.YDHY	297
TKL2	239	....I.....LQQG TA-G..... K.DD.KQLKK RW.FD.NKS. V..QE.YDYY	297
TK-23	376	SRHVPEGAAL EAG-WNTKPA EYERKYPEEA AELKSITTGE LPAGWEKALP TYTPESPADA	434
TKL1	298	QRTILKPGVE ANNK.NKL.S ..Q..F..LG A..ARRLS.Q ...N..SK.. ....AKDS.V.	357
TKL2	298	KKT.V.PGQK LNEE.DR..E ..KT.F..KG K..QRRLN.E ..E...KH.. KF..DDD.L.	356
TK-23	435	TRNLSQQNLN ALAKVLPGL GGSADLASSN MTLMRMPGDF QKNTPEERN- LRFGVREHGM	493
TKL1	358	..KL.ETV.E DVVNQ..ELI .....TP.. L.RWKEAL.. .PPSSGSG.Y SGYI.YGIR	417
TKL2	357	..KT...V.T NMVQV..ELI .....TP.. L.RWEGAV.. .PPITQLG.Y AGRYI.YGVR	416
TK-23	494	---GAICNG NALHSPGLIP YCATFFVFTD YMRCAMRISA LSEAGVIYVM THDSIGLGED	549
TKL1	418	EHAM...M.. ISAFGAN YK. .GG..LN.VS .AA..V.L.. ..GHP..W.A .....V...	477
TKL2	417	EHG...M.. ISAFGAN YK. .GG..LN.VS .AA..V.LA.. .GNP..W.A .....	475
TK-23	550	GPTHQPIEHL ASFRAMPNIL MFRPADGKET AGAYKAVVLK RKTPSILALS RQKLPQLAGS	609
TKL1	478	.....T. .H..SL..Q VW.....N.V SA...NSLES KH....I....N....E..	537
TKL2	476	.....T. .HL..I..HV -W.....N.T SA..YS.IKS GR...VV... .N....EH.	534
TK-23	610	SIEGAAKGGY ILSDNSSGNK PDVILIGTGS ELEIAVKAAD ELR-KEGRAV RVVFVCWEL	668
TKL1	538	...S.S.... V.Q.VA---N ..I..VA... .VSL.S.E..K T.AA.NI..- ..LPDFFT	593
TKL2	535	.F.K.L.... VIH.VE---N ..I..VS... .VS.SID..K K.YDTKKIKA ....LPDFYT	591
TK-23	669	FEEQSADYKE SVPSSVTAR VSIEAGSTFG WEKYVGSKGK AIGIDRWGAS APAGKIYKEY	727
TKL1	595	.DK.PLE.RL ....DN.PIM -.V.VLA.TC .G..AHQSFG IDRFGAS.KA PEVF.FFGFT	652
TKL2	592	.DR..EE.RF ....DG.PIM -.F.VLA.SS .G..AHQSFG LDEFGRS.KG PEIY.LFDFT	650
TK-23	728	GITAEAVVA AKQVS	743
TKL1	653	PEGVAERAQK TIAFYKGDKL ISPLKKAF	680
TKL2	651	ADGVASRAEK TINYKKGQL LSPMGRF	678

Abbildung 4

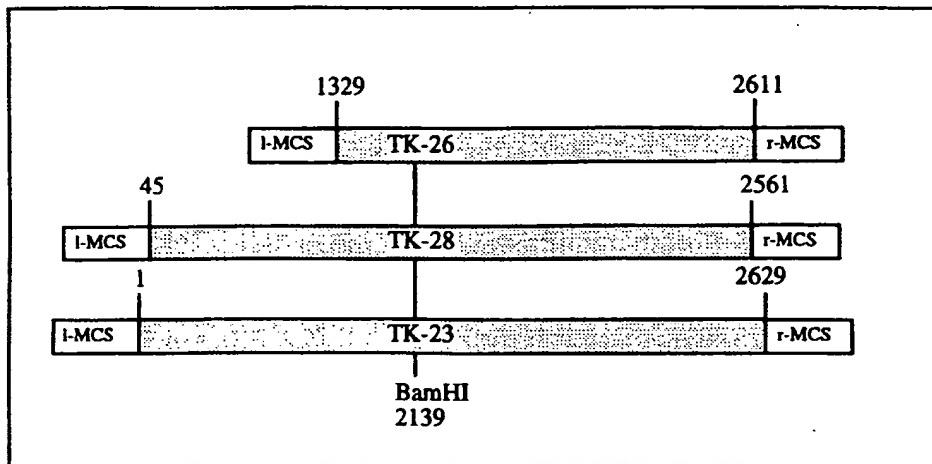
**Gewebespezifische Expression der plastidären Transketolase in  
Tabakpflanzen**



**Legende:** Spur 1, Sink-Blatt; Spur 2, Source-Blatt; Spur 3, Blütenknospe;  
Spur 4, Internodien; Spur 5, Nodien; Spur 6, Cortex; Spur 7, Wurzel;  
Spur 8, geöffnete Blüte

**Abbildung 5**

**Aufbau der Transketolase cDNA-enthaltenden Plasmide**



**l-MCS: Linke Polylinkersequenz**

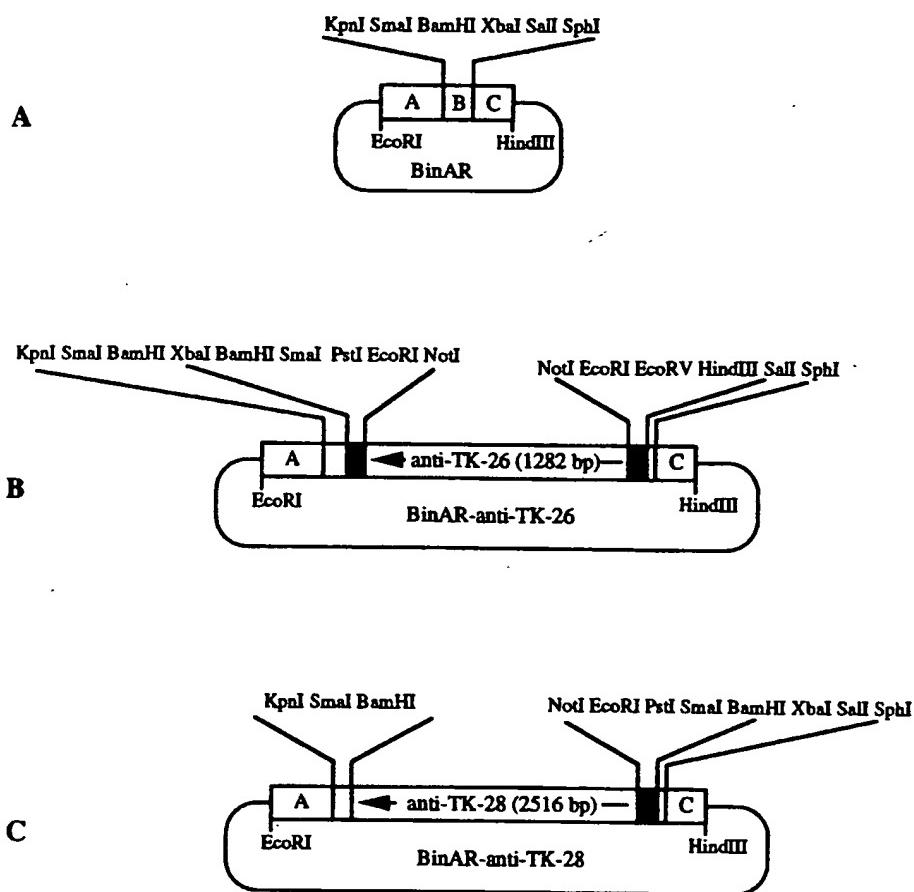
SacI ——— SacII ——— NotI ——— XbaI ——— SpeI ——— BamHI ——— SmaI ——— PstI ——— EcoRI ——— NotI  
 5' - GAGCTCCACCGCGGTOGCCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGCTGCAGGAATTGGCGGGCGC -3'

**r-MCS: Rechte Polylinkersequenz**

NotI ——— EcoRI ——— EcoRV ——— HindIII ——— Sall ——— HincII ——— XbaI ——— KpnI  
 5' - GCGCCCGGAATTGATATCAAGCTTATCGATAACCGTCGACCTCGAGGGG000CCCCTGACC -3'

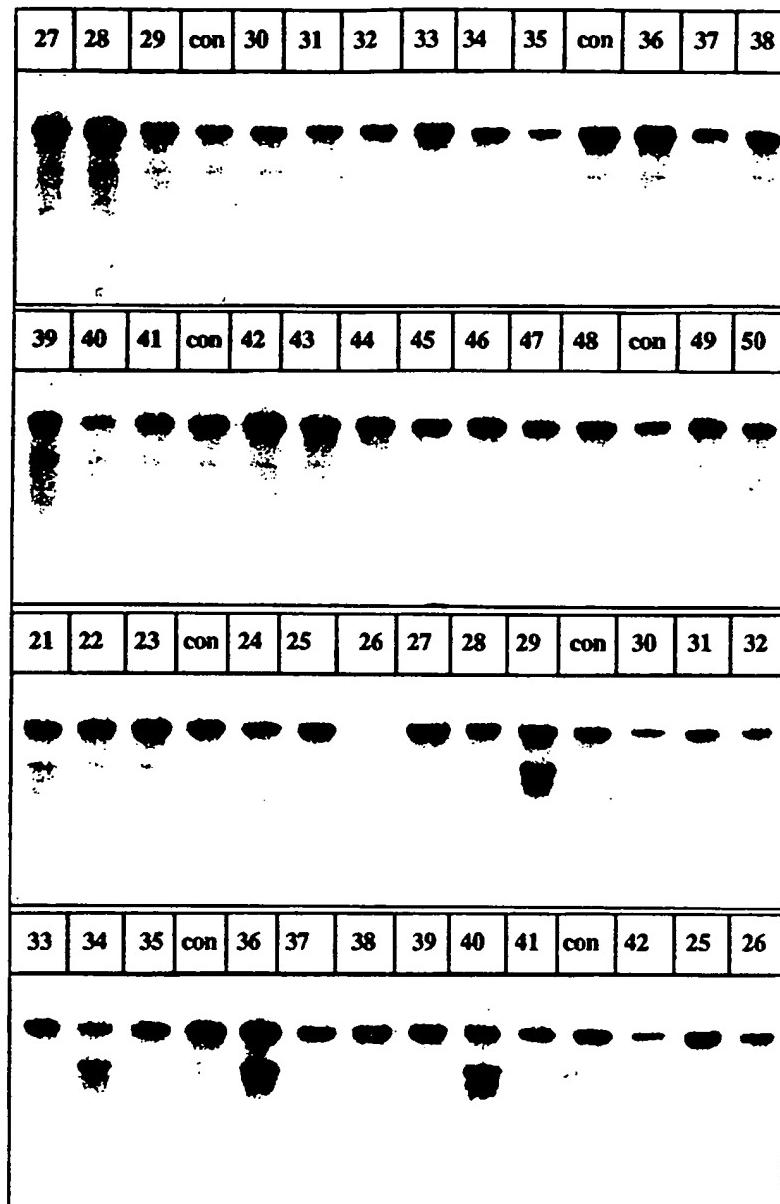
**Abbildung 6**

**Konstruktion pflanzlicher Expressionskassetten zur Antisense-Inhibierung  
der plastidären Transketolase**



**Abbildung 7**

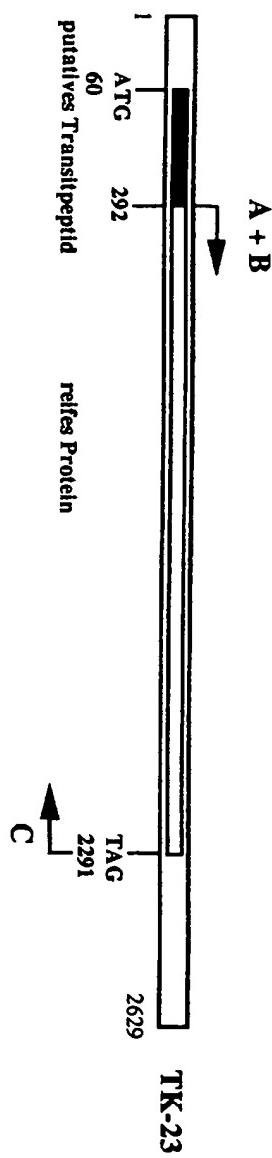
Antisense Inhibierung der plastidären Transketolase in transgenen Tabakpflanzen:  
RNA-Analyse der Transformanden in Gewebekultur



Legende: Nummern, Bezeichnung der einzelnen unabhängigen  
Transformanden; con, untransformierte Kontrolle; A und B,  
Antisense-Konstrukt TK-28; C und D, Antisense-Konstrukt TK-26

Abbildung 8

**PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase**



PCR-Primer:

A: 5'- AA GTC GAC GAA TTC AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC -3'  
Sall EcoRI TK reifes Protein  
38mer

B: 5'- AA GAA TTC ATG CAT CAT CAT CAT CAT AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC -3'  
EcoRI Met 6x His TK reifes Protein  
53mer

C: 5'- TT GTC GAC GAA TTC CTA AGA AAC TTG TTT AGC TGC AGC -3'  
Sall EcoRI Stop  
38mer

**Abbildung 9**

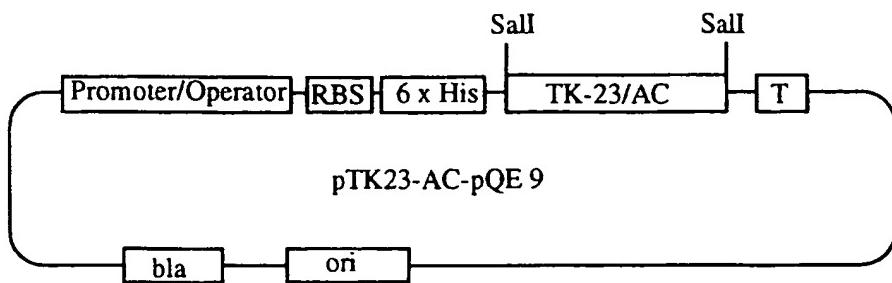


Abbildung 10

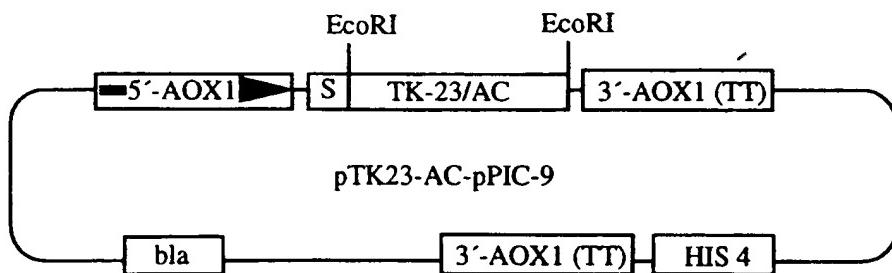


Abbildung 11

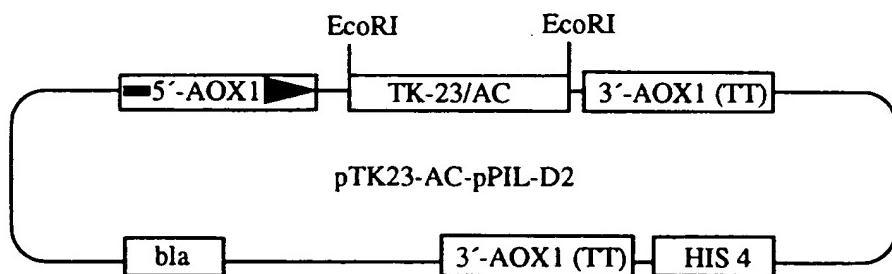
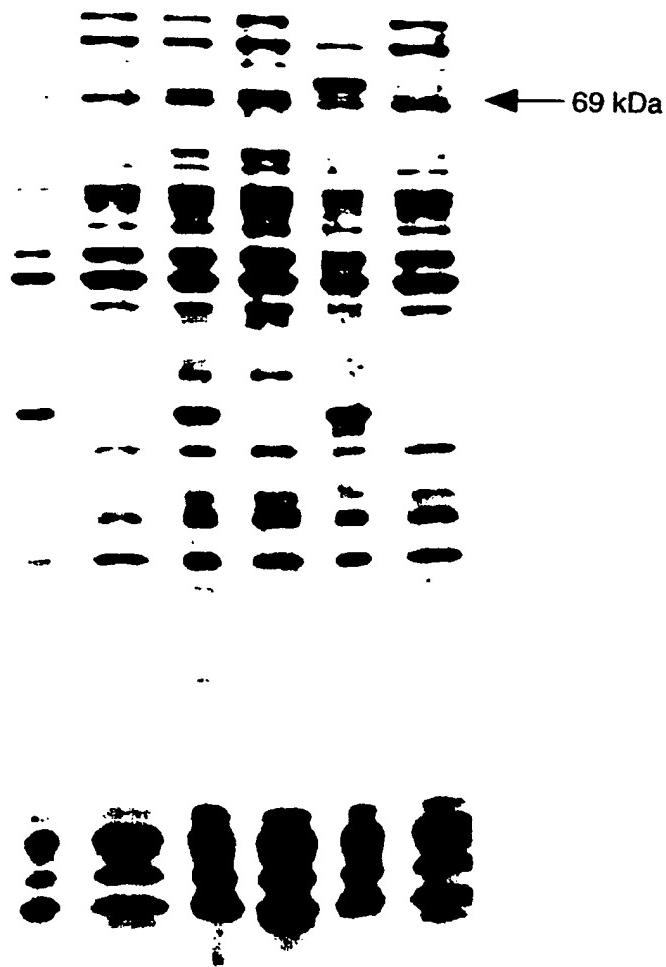


Abbildung 12

**Expression der plastidären Transketolase in *E. coli* Zellen**

Bakterienkultur	Kontrolle	TK-Antisense	TK-Sense
IPTG	+	-	+
			-



**Abbildung 13**